



# Suplementación dietética de ácido siálico mejora el aprendizaje y la memoria en los lechones<sup>1-3</sup>

Bing Wang, Bing Yu, Muhsin Karim, Honghua Hu, Yun Sun, Paul McGreevy, Peter Petocz, Suzanne Held, y Jennie Brand-Miller

## RESUMEN

**Antecedentes:** Ácido siálico, un componente clave de los oligosacáridos de la leche humana y tejidos neuronales, puede ser un nutriente condicional durante los períodos de crecimiento rápido del cerebro.

**Objetivo:** Probamos la hipótesis que las variaciones en el contenido de ácido siálico de una leche maternizada influiría el comportamiento del aprendizaje temprano y la expresión genética de las enzimas implicadas en el metabolismo del ácido siálico en lechones.

**Diseño:** Lechones ( $n=54$ ) fueron asignados a 1 de 4 grupos alimentados con sustituto de leche de cerda complementado con cantidades crecientes de ácido siálico como glicomacropéptido de caseína por 35 días. El rendimiento del aprendizaje y la memoria se evaluaron con el uso de señales visuales fáciles y difíciles en un laberinto radial de 8 brazos. Se midieron las concentraciones del gangliósido y la sialoproteína cerebral y la expresión del mRNA de 2 genes asociados al aprendizaje (*ST8SIA4* y *GNE*).

**Resultados:** En ambas pruebas, los grupos complementados aprendieron en significativamente menos ensayos que hizo el grupo control, con una relación dosis-respuesta para la tarea difícil ( $P=0.018$ ) pero no en la tarea fácil. En el hipocampo, se observaron las relaciones dosis-respuesta significativas entre la cantidad de los niveles de suplementación de ácido siálico y de mRNA del *ST8SIA4* ( $P=0.002$ ) y *GNE* ( $P=0.004$ ), correspondiente con aumentos proporcionales en las concentraciones de ácido siálico ligado a las proteínas en la corteza frontal.

**Conclusiones:** Alimentación de una fuente de ácido siálico unido a las proteínas durante el desarrollo temprano del aprendizaje mejorado y la expresión aumentada de 2 genes relacionados con el aprendizaje en el desarrollo de los lechones. El ácido siálico en leches mamíferos podría desempeñar un papel en el desarrollo cognitivo. *Am J Clin Nutr* 2007;85:561-9.

**PALABRAS CLAVE** Suplementación de ácido siálico, aprendizaje y memoria, expresión génica, desarrollo del cerebro, lechones

## INTRODUCCIÓN

Un gran cuerpo de evidencia muestra que la lactancia proporciona ventajas cognitivas a largo plazo, particularmente para los bebés prematuros o nacidos pequeños (1, 2). La pregunta es ¿por qué? El tema sigue siendo polémico porque es difícil desenmarañar los factores genéticos, ambientales y nutricionales. La cuestión es de profunda importancia clínica y de salud pública. Los avances en las tecnologías reproductivas han aumentado el número de temprano de recién nacidos o pequeños para la edad gestacional (3), sin embargo, los resultados del desarrollo neurológico a largo plazo siguen siendo pobres (4, 5). Son comunes el rendimiento académico más bajo y dificultades psicosociales y de aprendizaje, especialmente problemas de percepción visoespacial

(6). La evidencia de que la ingesta del nutriente per se es crítica proviene de raros ensayos controlados aleatorizados que mostraron mayor IQ en bebés prematuros que fueron alimentados con fórmulas enriquecidas (7). Por lo tanto, es un objetivo importante la identificación de nutrientes claves para el desarrollo cognitivo.

Ácido siálico, una molécula de azúcar de 9 carbonos con una fuerte carga negativa (también conocido como ácido *N*-acetilneuramínico), se produce en grandes cantidades como un componente de los oligosacáridos de la leche humana (8, 9). El ácido siálico es también el residuo funcional terminal de los gangliósidos y glicoproteínas cerebrales, tales como la molécula de adhesión celular neural (NCAM). El cerebro de los bebés amamantados tiene mayores cantidades de ácido siálico ligado al gangliósido y ligado a la glicoproteína que hacen los bebés alimentados con fórmula (10). En comparación con la leche humana madura ( $=0.7$  g/L), las fórmulas infantiles proporcionan poco ácido siálico ( $0-0.2$  g/L). En modelos animales, una fuente exógena de ácido siálico aumentó el rendimiento del aprendizaje, así como la concentración de ácido siálico en la corteza frontal del cerebro (11, 12).

Entender las bases bioquímicas del aprendizaje, la memoria y el desarrollo cognitivo son también desafíos importantes. Los cambios en el estado de polisialilación de la NCAM ocurren durante la migración celular de neurita, sinaptogénesis (13, 14) y el aprendizaje (15, 16). Dos polisialiltransferasas (*a*-2,8-sialiltransferasa II y IV, abreviado como *ST8SiaII* y *ST8SiaIV*, respectivamente) son las enzimas claves involucradas en el metabolismo del ácido siálico y han sido vinculados al comportamiento del aprendizaje (17). Aunque el hígado puede sintetizar el ácido siálico de novo a partir de la glucosa, la actividad de la enzima limitante, UDP *-N*- acetilglucosamina-2-epimerasa, es baja durante el periodo neonatal (18).

Sobre la base de esta evidencia, presumimos que una fuente exógena de ácido siálico podría ser necesaria durante periodos de

<sup>1</sup> De la unidad de Nutrición Humana, Escuela de Biociencias Moleculares y Microbianas (BW, MK, HH, YS y JB-M), Departamento de Genética Molecular y Clínica, Hospital Royal Prince Alfred (BY), Facultad de Ciencias Veterinarias (PMcG), Universidad de Sidney, Sidney, NWS, Australia; Departamento de Estadística, Universidad Macquarie, Sidney, NSW, Australia (PP); y el Centro para la Biología Conductual, Departamento de Ciencia Clínica Veterinaria de la Universidad de Bristol, Bristol, Reino Unido (SH).

<sup>2</sup> Apoyado por la donación de investigación 302016 del Consejo Nacional de Investigación Médica y de la Salud (MRC & NH) de una subvención del proyecto de Mead Johnson Nutritionals de Estados Unidos y la Mancomunidad de Australia.

<sup>3</sup> Las solicitudes de reimpresión para J Brand-Miller, Unidad de Nutrición Humana, Escuela de Biociencias Moleculares y Microbianas, G08, Universidad de Sidney, NSW, 2006, Australia. Correo electrónico: j.brandmiller@mmb.usyd.edu.au.

Recibido el 10 de marzo de 2006.

Aceptado para su publicación 2 de octubre de 2006.

crecimiento rápido del cerebro. Utilizando un modelo animal apropiado del bebé humano, hemos diseñado una serie de estudios para determinar si la suplementación de ácido siálico temprana aumentó el rendimiento del aprendizaje y de la memoria, el ácido siálico ligado a proteínas cerebrales y ligado a gangliósido, y niveles de mRNA de las enzimas clave, UDP-N-acetilglucosamina-2-epimerasa /N-acetilmanosamina quinasa (*GNE*) y *ST8SiaIV*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Se escogieron lechones porque desarrollo la estructura y función cerebral durante el desarrollo se asemeja al de los infantes humanos (19, 20). El lechón recién nacido es menos maduro hablando de desarrollo, y su peso corporal es relativamente pequeño en relación a su peso de madurez. Por esta razón, los lechones recién nacidos y lactantes de bajo peso al nacer son vulnerables a los déficits del desarrollo. Lo importante es el nacimiento de ambas especies que ocurre en medio del chorro del desarrollo de la acreción de la masa cerebral (19). Finalmente, el sistema digestivo del cerdo comparte fisiología y estructura anatómica similar con los infantes humanos y tiene necesidades de nutrientes comparables. Esto hace el lechón ideal para las investigaciones nutricionales coordinadas, metabólicas y moleculares.

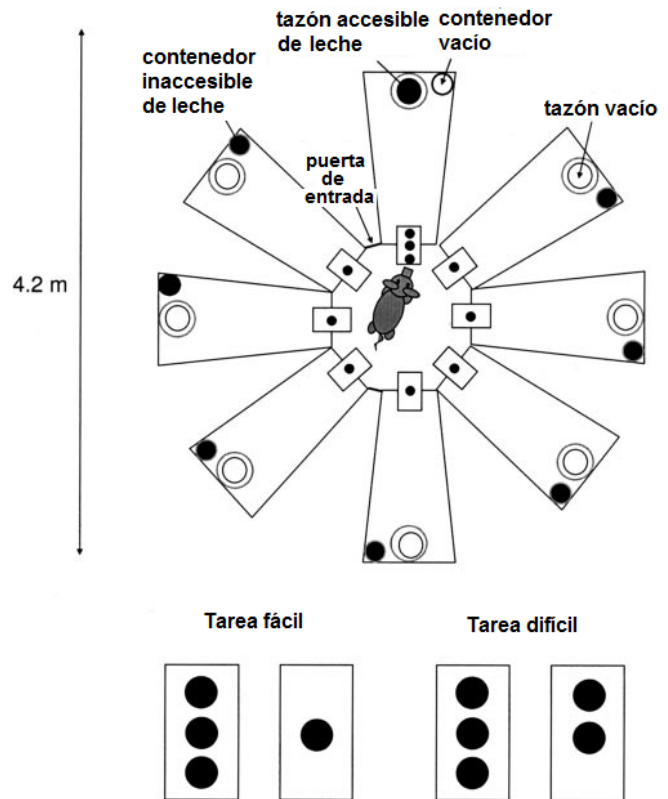
Lechones domésticos machos de tres días de edad (*Sus scrofa*, Landrace/Large White cross) de 1.5-2.4 kg de peso se adquirieron en una granja comercial ( $n=54$ ), estratificado según peso y camada y asignados al azar a 1 de 4 tratamientos. Estaban alojados en pares en una sala de control de temperatura con un ciclo de luz de 12 hr (0800–2000) y de oscuridad (2000–0800). Los corrales caseros contenían un "nido" (un neumático de goma cubierta con una toalla), una lámpara de calor, y un juguete de plástico idénticas. Un lechón murió de neumonía en 2 semanas de edad, dejando 53 animales en el análisis final. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética Animal de la Universidad de Sidney.

### Suplementación de glicomacropéptido de caseína

Glicomacropéptido de caseína (CGMP) proporcionando 60 mg ácido siálico/g fue mezclado en el sustituto de la leche del cerdo (productos alimenticios Wombaroo, Glen Osmond, Australia) en concentraciones especificadas. La cantidad de la leche final varió según el grupo: 140 mg/L (grupo 1, el grupo control sin añadido de CGMP,  $n=14$ ), 300 mg/L (grupo 2, dosis baja,  $n=13$ ), 635 mg/L (grupo 3, dosis media,  $n=14$ ) y 830 mg/L (grupo 4, dosis más altas,  $n=12$ ). Estas concentraciones representan un consumo aproximado de 40, 85, 180 y 240 mg  $\cdot$  kg peso corporal<sup>-1</sup>  $\cdot$  d<sup>-1</sup>, respectivamente, siendo la dosis más alta comparables con las cantidades presentes en la leche de la cerda (840 mg/L, datos no publicados, 2003) y la leche humana (700 mg/L en la leche madura). Los sustitutos de leche fueron formulados para que la ingesta de proteína total siga siendo la misma independientemente de la cantidad de CGMP agregado. Para mantener las tasas normales de crecimiento, los lechones recibieron 285 mL leche  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  d<sup>-1</sup> en las primeras 2 semanas del estudio y 230 mL  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  d<sup>-1</sup> en las semanas restantes. Los tiempos de alimentación fueron a las 0800, 1300, 1800 y 2230, con un adicional de 50 mL leche/cerdo proveído en la última alimentación. El peso corporal, la ingesta de leche y el estado de salud de los lechones se registraron diariamente.

### La capacidad de aprendizaje y la evaluación del rendimiento de la memoria

Para reducir el estrés al principio, se nos permite dos lechones en cada par en el laberinto de habituación 1 día antes de la prueba



**FIGURA 1.** Representación esquemática de la zona de aprendizaje con laberinto radial de 8 brazos y las señales visuales utilizadas para las tareas de aprendizaje fácil y difícil.

Las pruebas de aprendizaje formal comenzaron el día 21 con el uso de un laberinto radial de 8 brazos (Figura 1) adyacente a los corrales caseros. Una cámara de video se instaló arriba para grabar las pruebas de aprendizaje y de memoria. Se realizaron dos pruebas de aprendizaje: tarea 1 y tarea 2. Ambas pruebas tenían leche accesible (correspondiente a su grupo de tratamiento) en 1 brazo, y leche inaccesible en los 7 brazos restantes, tal que todos los 8 brazos del laberinto dieron las mismas señales olfativas. En ambas pruebas, una señal visual que consta de 3 puntos negros fue colocada al azar en una puerta con leche accesible en el brazo. En la tarea 1 (la tarea fácil), se colocó un punto negro en las 7 puertas restantes. En la tarea 2 (la tarea más difícil), se colocaron 2 puntos negros en las 7 puertas restantes. La posición de la señal visual de 3 puntos negros fue cambiada entre los ensayos en un orden aleatorio predeterminado.

Se probaron todos los lechones en el laberinto individualmente. Se llevaron a cabo cuarenta ensayos de tarea 1 durante 5 días (8 ensayos/día) y 40 ensayos de tarea 2 durante 6 días. Se determinó el rendimiento del aprendizaje como el número de pruebas tomadas para aprender con éxito la señal visual y el número de errores (puertas equivocadas) y éxitos (puerta correcta) en encontrar el brazo de leche accesible durante cada ensayo. Se registró un error cada vez que el lechón ha entrado o pone su cabeza a través de una puerta equivocada. Se registró un éxito sólo cuando los lechones entraron a la puerta correcta y encontraron la leche accesible. El criterio para aprender la localización visual fue un máximo de 1 error en tres ensayos consecutivos. Dos días después de la terminación de cada conjunto de ensayos, la misma tarea se presentó como una "prueba de memoria" sólo para un ensayo. Todas las pruebas fueron realizadas por personal capacitado, uno de los cuales no quedó ciego a la cantidad de la ingesta de ácido siálico. Los resultados fueron corroborados por análisis independiente del material de video. En el día 34 o 35, los lechones fueron sacrificados; los tejidos fueron recogidos y almacenados a -80 °C. Se midieron los ácidos siálicos ligados al gangliósido de la corteza



y el ligado a las proteínas según métodos publicados (10, 21). Se determinó la actividad de la sialitferasa con el uso de un método modificado por Laroy et al (22). Porque el estrés puede influenciar el aprendizaje y la memoria, se midió la concentración de cortisol en sangre por la mañana a intervalos semanales comenzando el día 7 con el uso de un kit comercial (Coat-A-Count Cortisol; Diagnóstico Products, Doncaster, Australia).

**Cuantificación relativa del mRNA del gen objetivo**

Fue extraído el ARN total de 3 áreas distintas: hipocampo, corteza frontal e hígado de lechones con el uso del sistema de aislamiento de ARN total de SV (Promega, Madison, WI) y se convirtió en el cADN de la transcriptasa reversa (Superíndice III; Invitrogen, Carlsbad, CA) y hexámeros al azar. El análisis cuantitativo se realizó con el uso de la reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (PCR) con SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se caracterizaron dos secuencias de genes del cerdo objetivo (*ST8SIA4* y *GNE*) por nuestro grupo (GenBank adhesión no. DQ133503 y DQ132898, respectivamente), mientras que se recuperó la secuencia del gen de referencia (cerdo 18S ARN ribosomal) de GenBank (AY265350). Se establecieron todas las PCR en tiempo real con el uso del robot del manejo de líquidos (epMotion 5070; Eppendorf, Hamburgo, Alemania) con el volumen total de 10 µL y analizadas en triplicado. Las condiciones de la PCR y las secuencias del cebador están disponibles bajo petición. La cuantificación se realizó en el Detector de Secuencia ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystems). Los niveles de mRNA fueron representados por los niveles de cADN correspondiente, y los niveles relativos de mRNA se expresaron como  $(E_{\text{blanco}})^{\text{promedio } C_t} / (E_{\text{referencia}})^{\text{promedio } C_t}$ , donde  $E_{\text{blanco}}$  y  $E_{\text{referencia}}$  son las eficiencias de la PCR determinadas mediante el uso de un software libre de suposición LINREGPCR (versión 7.5; Dr JM Ruijter, Centro Médico Académico, Ámsterdam, Países Bajos) (23) y  $C_t$  es los números del ciclo umbral y se determinó con el uso del software SDS (versión 2; Applied Biosystems). Se observaron entre las eficiencias de la PCR del 96% y el 100% para los genes objetivo y de referencia (datos no mostrados). Primero se normalizaron los niveles de mRNA del objetivo individual a su gen de referencia 18S rARN en el mismo lugar. Finalmente, se consideró el valor promedio del grupo de control como un calibrador, y los grupos restantes con diferentes cantidades de suplementos de ácido siálico se expresaron como una relación de doblez  $n$  en los gráficos en comparación con el calibrador. Demostramos que el 18S rARN es un gen de referencia adecuado en el estudio porque no se observó variación significativa en sus niveles de cADN entre los grupos y las localizaciones (datos no mostrados). Miembros del personal de laboratorio que emprendieron los ensayos bioquímicos estaban cegados al tratamiento.

**Análisis estadístico**

Las diferencias en el aprendizaje (número de ensayos necesarios para aprender la señal visual) se compararon con el uso del análisis de supervivencia de Kaplan-Meier con regresión de Cox para examinar posibles covariables que pueden influir en el aprendizaje. Se realizaron comparaciones entre promedios (con o sin covariables) con el uso del modelo lineal general [análisis univariante de varianza (ANOVA)] con el ajuste de Bonferroni para comparaciones múltiples donde es apropiado. La correlación de Pearson fue utilizada para examinar la relación entre el número de errores, peso corporal y rendimiento de la memoria. Todos los análisis estadísticos se completaron con el uso de SPSS para WINDOWS 11 y 12 (SPSS Inc, Chicago, IL). Se utilizó un nivel de significancia de 0.05.

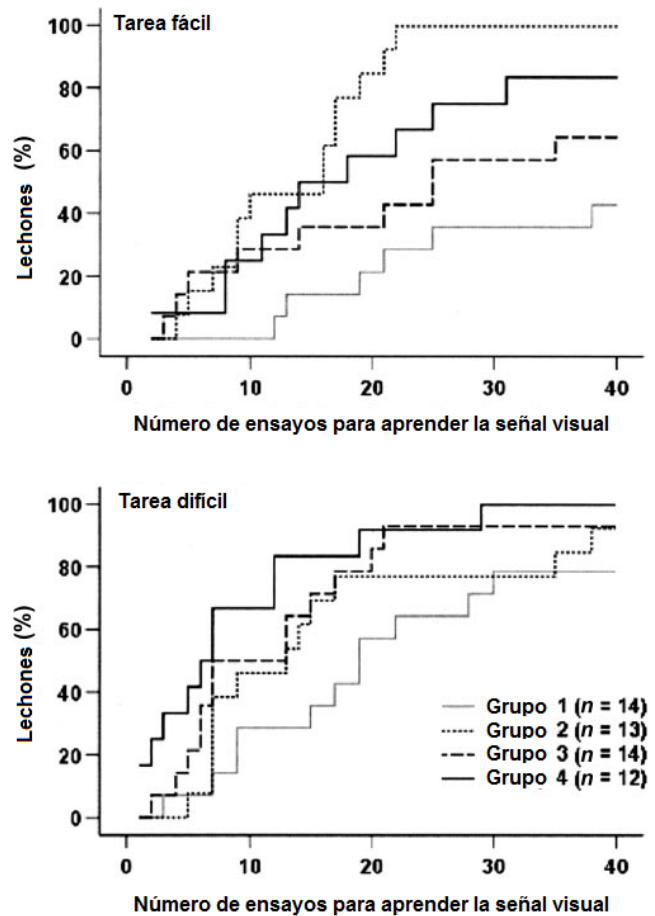


FIGURA 2. El porcentaje de lechones en cada grupo que aprendió la señal visual (alcanzado el criterio de aprendizaje) dentro de un determinado número de ensayos.

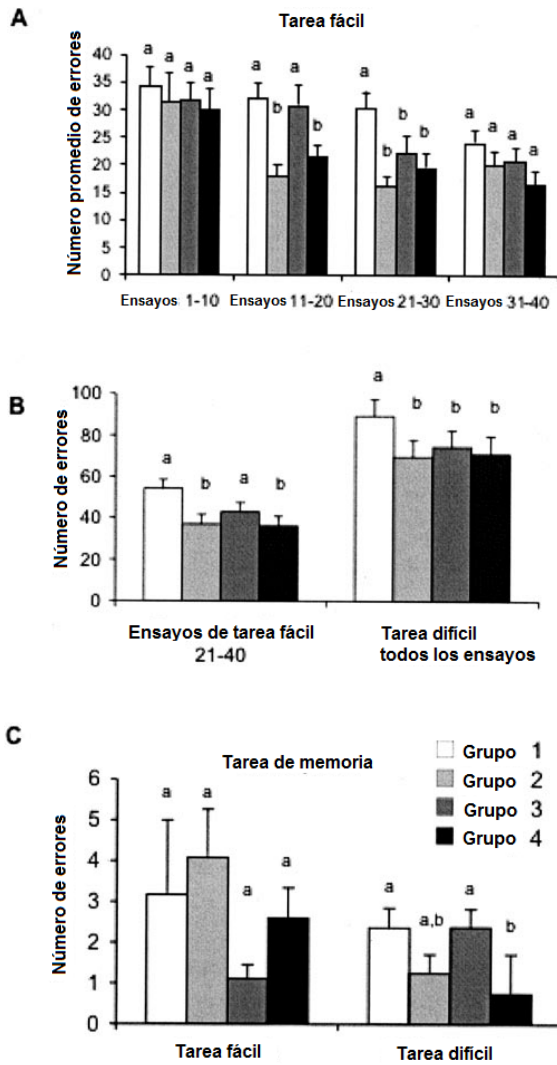
**RESULTADOS**

**Rendimiento de aprendizaje**

En las tareas fáciles y difíciles, los grupos suplementados de ácido siálico alcanzaron el criterio de aprendizaje más rápido que el grupo control ( $P = 0.001$ , Kaplan-Meier, en tarea 1 y  $P = 0.018$  en tarea 2; **Figura 2**). En la tarea fácil, sólo el 45% del grupo control alcanzó el criterio dentro de 40 ensayos comparada con  $>70\%$  en los otros grupos, pero no se observó ningún efecto dosis-respuesta ( $P = 0.122$ , regresión de Cox). En la tarea difícil, el 100% de los lechones en el grupo 4 alcanzó el criterio dentro de 30 ensayos comparado con sólo el 70% del grupo control, con un efecto claro de dosis-respuesta ( $P = 0.003$ , regresión de Cox). Los resultados permanecieron sin cambios cuando se ajustó por peso corporal o la tasa de ganancia de peso (datos no mostrados).

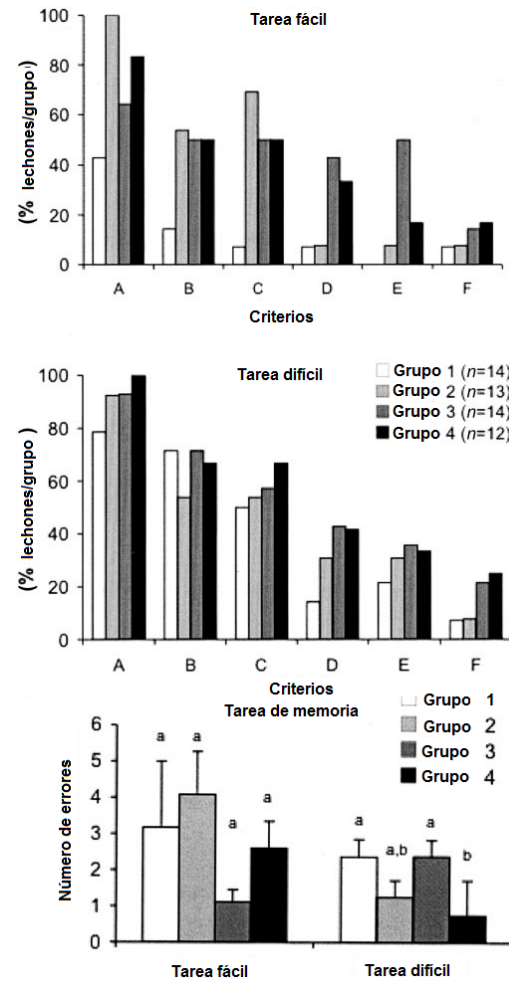
También se consideraron el número total de errores (es decir, el número de veces que el lechón eligió la puerta equivocada) como medida de aprendizaje (**figura 3A**). Porque el aprendizaje en los primeros 20 ensayos de la tarea fácil fue probablemente sea predominante "ensayo y error", se consideraron los ensayos 21 – 40 por separado. El grupo de control hizo significativamente más errores que los grupos suplementados para ambas tareas ( $P = 0.016$  para los ensayos 21 – 40 de la tarea 1 y  $P = 0.048$  para todos los ensayos en la tarea 2; **Figura 3B**), pero no hubo orden de la dosis respuesta. Ya que los lechones habrían utilizado el aprendizaje en la primera tarea para facilitar el aprendizaje en el segundo, se consideraron el número total de errores cometidos en la primera como una covariable del aprendizaje en la tarea 2.





**FIGURA 3.** La suma total de errores (es decir, número de veces que el lechón eligió la puerta equivocada) también fue considerada una medida del rendimiento del aprendizaje. A: Número de errores durante las diferentes etapas de la tarea fácil. Todos los grupos tienden a hacer menos errores como aprendizaje progresado. B: Número de errores en la segunda mitad de la tarea fácil (ensayos 21-40) y todos los 40 ensayos de la tarea difícil. Hubo diferencias entre los grupos suplementados (grupo 1) y control (grupos 2, 3 y 4) en ambas tareas pero ningún efecto dosis-respuesta. C: Número de errores en la prueba de memoria de las tareas fáciles y difíciles. Cuarenta y ocho horas después de la terminación de cada conjunto de ensayos, un ensayo de la misma tarea se presentó como una prueba de memoria. Sólo los lechones que habían alcanzado el criterio de aprendizaje fueron probados. El número de lechones fue 6, 13, 9 y 10 en la tarea fácil y 11, 12, 13 y 12 en la tarea difícil para los grupos 1, 2, 3 y 4, respectivamente. Las columnas con letras diferentes dentro de un grupo son significativamente diferentes ( $\bar{x} \pm SE$ ;  $P < 0.05$ ) basado en un modelo lineal general (ANOVA univariante) con ajuste de Bonferroni para comparaciones múltiples.

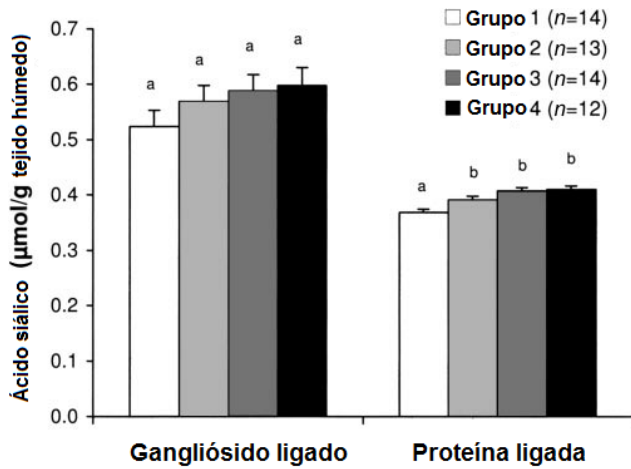
La diferencia entre los grupos seguía siendo altamente significativa ( $P = 0.002$ ), y el efecto dosis-respuesta no fue alterado. Los hallazgos fueron similares cuando se consideraron los últimos 20 ensayos en la tarea 2 considerado por separado o cuando se utilizaron errores 1 – 10 en los ensayos como covariable ( $P = 0.016$ ).



**FIGURA 4.** Porcentaje de lechones en cada grupo que alcanzó diferentes criterios de aprendizaje en las tareas fáciles y difíciles. Los criterios de aprendizaje fueron (A) sólo 1 error a través de tres ensayos consecutivos, (B) sin errores en tres ensayos consecutivos, (C) 1 error a través de cuatro ensayos consecutivos, (D) sin errores en cuatro ensayos consecutivos, (E) 1 error dentro de cinco ensayos consecutivos y (F) sin errores a través de cinco ensayos consecutivos. Hubo diferencias significativas entre los grupos en el criterio A de aprendizaje de la tarea fácil ( $P=0.001$ ) y la tarea difícil ( $P=0.018$ ) y en los criterios C y E de la tarea fácil ( $P=0.006$  y  $0.003$ , respectivamente). Las diferencias entre los grupos en los demás criterios de aprendizaje no fueron significativas ( $P > 0.05$ , análisis de supervivencia de Kaplan-Meier).

En estudios como éste, la herramienta por la cual el aprendizaje y la memoria son evaluados es crítica. Si la prueba es muy fácil, todos los animales, incluyendo los controles, pueden aprender a un ritmo similar. Si la tarea es muy difícil, sólo unos pocos animales pueden aprender en absoluto, y será más difícil establecer una relación dosis-respuesta. El aprendizaje de una tarea difícil, sin embargo, se beneficia enormemente de entrenamiento previo en una versión más fácil de la misma tarea (24). En el presente estudio, cuando la tarea de aprendizaje fue relativamente simple, el rendimiento fue mejor sobre todo en los 3 grupos de tratamiento en comparación con el grupo control ( $P = 0.001$ ), pero no se observó ningún indicio de una relación dosis-respuesta ( $P = 0.122$ ). Podríamos haber planteado el nivel de dificultad haciendo el criterio de aprendizaje más estricto (por ejemplo, 1 error en 4 o 5 ensayos consecutivos, en vez de 3). Curiosamente, cuando analizamos retrospectivamente los datos mediante criterios de aprendizaje cada vez más estrictos, la relación dosis-respuesta era evidente, esta vez en ambas las tareas fáciles y difíciles (Figura 4).





**FIGURA 5.** Concentración promedio ( $\pm$ SE) de ácido siálico en la corteza frontal del cerebro. Las concentraciones de ácido siálico ligado a las proteínas fueron significativamente superiores en los grupos 2, 3 y 4 que en el grupo 1 ( $P = 0.029, 0.001$  y  $0.001$ , respectivamente). Las columnas con letras diferentes dentro de un grupo son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) basado en un modelo lineal general (ANOVA univariante) con ajuste de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Una limitación de nuestro método es que los lechones continuaron a ser probados por el número total de ensayos (cuando la prueba de memoria era administrada), independientemente de si alcanzaron el criterio de aprendizaje. Este "sobrepensamiento" era en gran medida inevitable. Si hubiéramos detenido los ensayos de esos lechones que alcanzaron el criterio temprano, el tiempo transcurrido entre el logro del criterio y la prueba de memoria habrían diferido entre los lechones. Alternativamente, habíamos administrado la prueba de la memoria inmediatamente, la edad de desarrollo de los lechones habría diferido en el tiempo de la prueba de la memoria y por lo tanto la eutanasia subsecuente.

**Prueba de memoria**

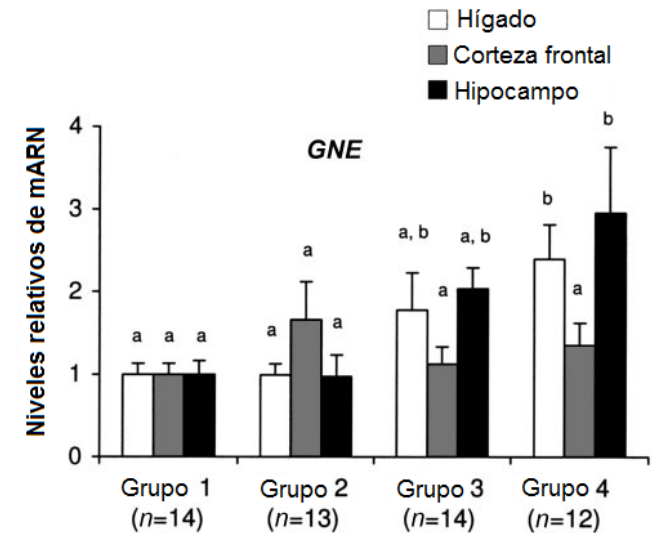
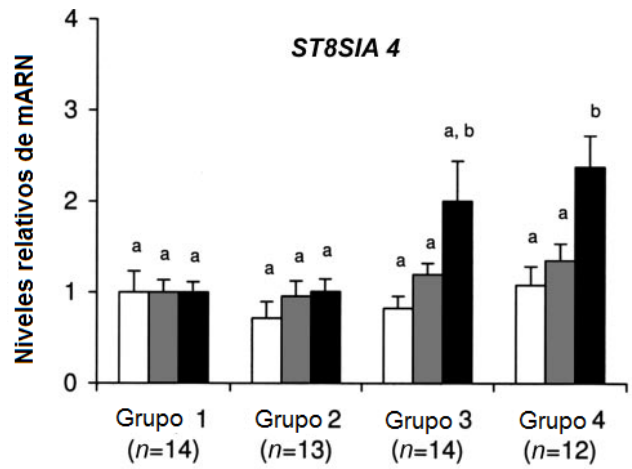
Sólo los lechones que habían alcanzado el criterio de aprendizaje fueron evaluados por su habilidad para recordar la señal visual. Los grupos suplementados valoraron más alto que el grupo control en la tarea difícil ( $P = 0.036$ ; Figura 3C) pero no la fácil ( $P = 0.285$ ), sin efecto dosis respuesta en ambos casos. Más errores en los ensayos de aprendizaje predijo un mayor número de errores en la prueba de memoria en la tarea 2 ( $P = 0.029$ ) pero no en la tarea 1 ( $P = 0.973$ ). El peso corporal, tasa de ganancia de peso y ritmo de aprendizaje no afectó significativamente el rendimiento de la memoria (datos no mostrados).

**Concentración cerebral de ácido siálico**

La concentración de ácido siálico ligado a las proteínas en la corteza frontal fue hasta un 10% mayor en los grupos suplementados que en el grupo control ( $P = 0.001$ , ANOVA), mostrando una relación dosis-respuesta significativa (Figura 5). La concentración de ácido siálico ligado al gangliósido también aumentó con la dosis, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $P = 0.307$ , ANOVA). Sobre una base de lechón individual, una mayor concentración de ácido siálico en la corteza frontal tiende a predecir aprendizaje más rápido y mejor memoria en ambas tareas, pero ninguna de las correlaciones, si paramétrico o no paramétrico, fueron estadísticamente significativas.

**Expresión de *ST8SIA4* y *GNE***

El nivel de mRNA de *ST8SIA4* fue mayor en la corteza frontal y el hipocampo en comparación con el hígado ( $P = 0.001$ ),



**FIGURA 6.** Niveles promedio ( $\pm$ SE) de mRNA relativos de *ST8SIA4* y *GNE* en los diferentes tejidos. Los niveles en el grupo 1 se utilizaron para la referencia (1). Las columnas con letras diferentes dentro de un grupo son significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) basado en un modelo lineal general (ANOVA univariante) con ajuste de Bonferroni para comparaciones múltiples, incluyendo todas las 12 barras en un panel.

mientras que el nivel de mRNA de *GNE* fue mayor en el hígado ( $P = 0.001$ ). Se observaron relaciones de dosis-respuesta entre la cantidad de suplementación de ácido siálico y del nivel de mRNA de *ST8SIA4* ( $P = 0.002$  en el hipocampo; Figura 6A) y *GNE* ( $P = 0.009$  en el hígado y  $P = 0.004$  en el hipocampo; Figura 6B). En el hipocampo, el nivel de mRNA de *ST8SIA4* era =2.5 veces superior en el grupo 4 que en el grupo 1 ( $P = 0.003$ ), mientras que en el hígado, el nivel del mRNA *GNE* era =3 veces mayor en el grupo 4 que en el grupo 1 ( $P = 0.004$ ). Se observaron correlaciones significativas entre la concentración de ácido siálico ligado a las proteínas en la corteza frontal y la expresión del hipocampo *ST8SIA4* ( $P = 0.029$ ) y *GNE* ( $P = 0.012$ ). Sobre una base individual, se observó una tendencia más alta para los niveles de mRNA del *ST8SIA4* en el hipocampo para correlacionar con el aprendizaje más rápido en la tarea 2 ( $P = 0.070$ ) pero no en la tarea 1 ( $P = 0.207$ ).

**Actividad de la Sialiltransferasa**

En la ausencia de un análisis específico para la isoforma del *ST8SialIV* (NCAM y endo-N no estaban disponibles en el momento del estudio), se evaluó la actividad total de la sialiltransferasa.



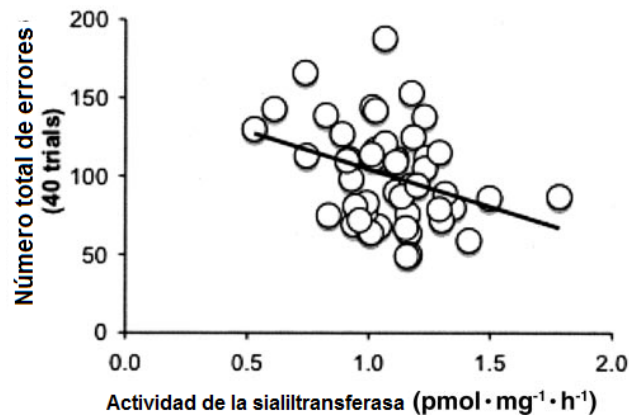
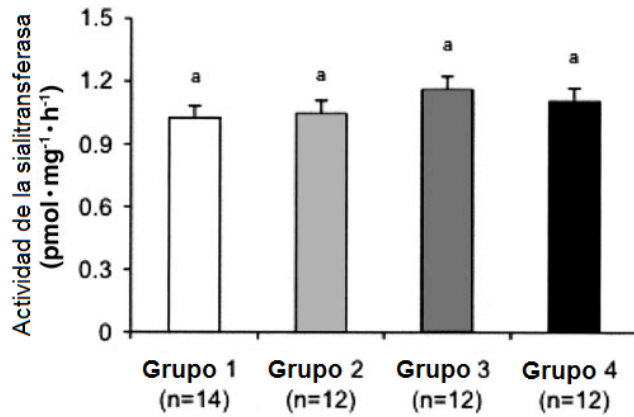


FIGURA 7. Actividad promedio ( $\pm$ SE) total de la sialiltransferasa en la corteza frontal del cerebro y la relación entre la actividad de la sialiltransferasa de la corteza frontal y el número de errores cometidos en la tarea fácil ( $r = -0.336$ ,  $P = 0.017$ ,  $n = 50$ ). Las columnas con las mismas letras entre los grupos no son significativamente diferentes ( $P > 0.05$ ) basado en un modelo lineal general (ANOVA univariante) con ajuste de Bonferroni para comparaciones múltiples.

El ensayo engloba la actividad de algunas 20 enzimas distintas responsables de catalizar la transferencia del ácido siálico del ácido siálico de citidina 5'-monofosfato a los conjugados glicosilados de la mitad del carbohidrato (25). No se observaron diferencias significativas entre el grupo control y los grupos suplementados ( $P = 0.400$ ; Figura 7A), y no se observaron ninguna correlación entre los niveles de mRNA del *ST8SIA4* y la actividad total de la sialiltransferasa ( $P = 0.705$  en la corteza frontal y  $P = 0.458$  en el hipocampo). Sin embargo, la actividad de la sialiltransferasa en la corteza frontal se correlacionó inversamente con el número de errores en la tarea fácil ( $r = -0.336$ ,  $P = 0.017$ ; Figura 7B).

### Ganancia de peso corporal

Peso corporal promedio ( $\pm$ SE) inicial fue la misma en cada grupo ( $2.1 \pm 0.04$  kg), y los animales ganaron peso en tasas similares (Figura 8). Aunque el grupo control pesó más que los otros grupos al final del estudio, las diferencias no fueron significativas en el día 21 ( $P = 0.068$ ) o el día 28 ( $P = 0.68$ ) cuando comenzaron los ensayos fáciles y difíciles, ni fue la tasa de aumento de peso (en g/d) significativamente diferente entre los grupos ( $P = 0.503$ ).

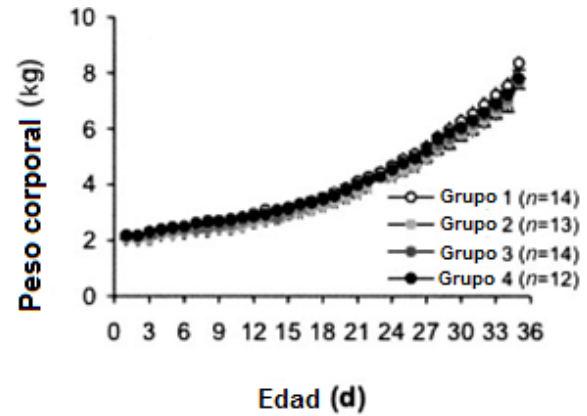


FIGURA 8. Ganancia de peso ( $\pm$ SE) promedio en cada grupo durante todo el estudio. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos ( $P > 0.05$ ) basado en un modelo lineal general (ANOVA univariante) con ajuste de Bonferroni para comparaciones múltiples.

### Cortisol Plasmático

Como una medida de la tensión, la concentración de cortisol promedio en cada grupo fue la mayor en la primera semana y disminuyó significativamente durante el periodo de estudio sin diferencias significativas entre los grupos ( $P = 0.285-0.547$ ) (Figura 9). Cuando la concentración de cortisol del plasma sanguíneo fue utilizada como covariable durante el aprendizaje, no se observaron efectos significativos ( $P > 0.05$ ).

### Contenido de aminoácidos

Aunque la ingesta de proteína total fue la misma en cada grupo, el patrón del aminoácido varió ligeramente (Tabla 1). Esta diferencia era inevitable porque la composición de los aminoácidos de CGMP difiere de otras proteínas de la leche de vaca, y otras fuentes de ácido siálico eran menos factibles desde el punto de vista práctico.

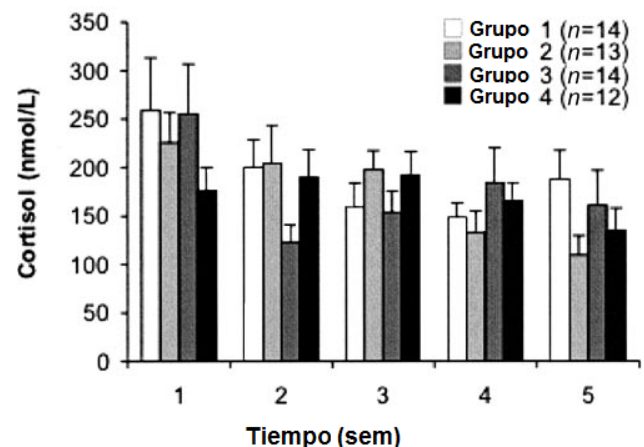


FIGURA 9. Concentraciones promedio ( $\pm$ SE) de cortisol del plasma de la sangre fueron evaluadas como una medida de la tensión. Se recolectaron muestras una vez por semana por 5 semanas en la misma hora del día. La muestra de sangre final fue recogida justo antes de la eutanasia. Las concentraciones plasmáticas de cortisol no variaron por grupo de tratamiento y no se correlacionaron con la memoria o la velocidad del aprendizaje ( $P > 0.05$ ) basado en un modelo lineal general (ANOVA univariante) con ajuste de Bonferroni para comparaciones múltiples. Las concentraciones de cortisol disminuyeron después de la primera semana y permanecieron constantes después de eso, lo que sugiere que los lechones estaban habituados a su medio ambiente a comienzos de la semana 2.



**TABLA 1**

Composición estimada de aminoácidos en los sustitutos de leche de cerdo<sup>1</sup>

Aminoácido	Leche 1	Leche 2	Leche 3	Leche 4	Leche de puerca
	<i>g/100 g de proteína</i>				
Arginina	8.0	6.0	5.8	5.4	5.8
Histidina	2.7	2.7	2.5	2.1	2.8
Isoleucina	4.9	5.6	6	6.5	4.1
Leucina	8.2	8.7	8.2	7.4	8.6
Lisina	6.3	7.2	7.1	6.8	7.6
Metionina	1.3	1.9	1.8	1.7	1.7
Cistina	1.1	0.8	0.8	0.9	1.6
Metionina + cistina	2.4	2.7	2.6	2.6	3.3
Fenilalanina	5.3	5.1	4.7	4.2	4.0
Tirosina	3.9	4.4	3.9	3.3	4.5
Treonina	3.7	4.6	5.4	6.6	4.2
Triptófano	1.3	1.2	1.17	1.1	1.3
Valina	5.1	6.1	6.1	6.2	5.4
Alanina	4.3	4.2	4.3	4.4	Trazas
Ácido aspártico	11.7	10.0	10.2	10.4	Trazas
Ácido glutámico	18.8	21.0	20.0	20.0	Trazas
Glicina	4.2	3.2	3.1	3.1	Trazas
Prolina	5.4	8.2	7.9	7.6	Trazas
Serina	5.1	5.2	5.4	5.5	Trazas

<sup>1</sup> Sobre una base de materia seca, el sustituto de leche contiene la mezcla de 31% de proteína, 24% de carbohidratos, 40% de grasa y 5% de vitaminas y minerales. La proteína fue una mezcla de caseína, suero de leche, soya y glicomacropéptido de caseína en una proporción de 36:9:55:0 en leche 1, 36:3.5:53:7.5 en leche 2, 26.5:3.5:52:18 en leche 3 y 19:3.5:52.5:25 en leche 4. El carbohidrato era la lactosa. La grasa era una mezcla de grasa de leche, aceite vegetal y extracto del aceite de pescado que contiene 0.65% de ácido docosahexaenoico y ácido araquidónico en la mezcla final. La mezcla de vitaminas y minerales contenía =1.2–1.6% de Ca, =0.9–1.3% de P, =0.7–1.10% de sal, 2.30% de lisina, 9 mg de vitamina A/kg, 90 µg de vitamina D<sub>3</sub>/kg, 9 mg de vitamina B-2/kg, 500 mg de Mg/kg, 90 mg de hierro ferroso/kg, 15 mg de Zn/kg, 10 mg de Mn/kg, 8 mg de Cu/kg, 700 µg de I/kg, y 120 µg de Se/kg.

**DISCUSIÓN**

En el presente estudio, mostramos enlaces concurrentes entre la ingesta dietética, la expresión génica, la bioquímica del cerebro y el comportamiento del aprendizaje. De una manera dosis-respuesta, el ácido siálico suplementario se asoció con el aprendizaje más rápido, concentraciones más altas de ácido siálico ligado a las proteínas en la corteza frontal y 2 – 3 veces niveles mayores de mRNA de dos genes relacionados con el aprendizaje, *GNE* y *ST8SIA4*. Porque la leche materna es una fuente rica de ácido siálico, los resultados proporcionan un posible mecanismo para explicar el vínculo entre la lactancia materna y una inteligencia superior.

Cabe señalar las fortalezas y limitaciones de nuestro estudio. Aunque nuestros resultados sugieren que el ácido siálico influye en la memoria y el aprendizaje, no podemos descartar la posibilidad de que afecta a otros ámbitos del comportamiento tales como la motivación y motor o la función sensorial, que a su vez altera la capacidad del aprendizaje. Asimismo, las 2 pruebas de aprendizaje estaban destinadas a reflejar los diferentes niveles de dificultad, pero la interpretación está comprometida porque los lechones fueron de 2 diferentes edades (y maduración) en el momento de la prueba. Los lechones fueron la misma cepa de una sola granja, pero no pueden ser excluidas las diferencias genéticamente determinadas en la capacidad cognitiva. Las diferencias entre los grupos se redujeron mediante el estudio de un gran número de lechones (*n* = 53) representando a 14 diferentes camadas. Les estratificaron por camada y peso y luego los asignaron al azar a los 4 grupos de tratamiento diferentes que eran aproximadamente iguales en número, peso y hermanos de camada. No obstante, el poder para reconocer las diferencias del grupo en el estudio era pequeño y de mayor variabilidad en uno de los grupos redujo el nivel de significancia global. Aunque los resultados del rendimiento del aprendizaje fueron confirmados por análisis independiente sobre el material de video, el asistente responsable de la investigación para alimentación y las pruebas de laberinto no era ciego al tratamiento. Además, aunque la concentración de proteína total de cada leche era la misma, el

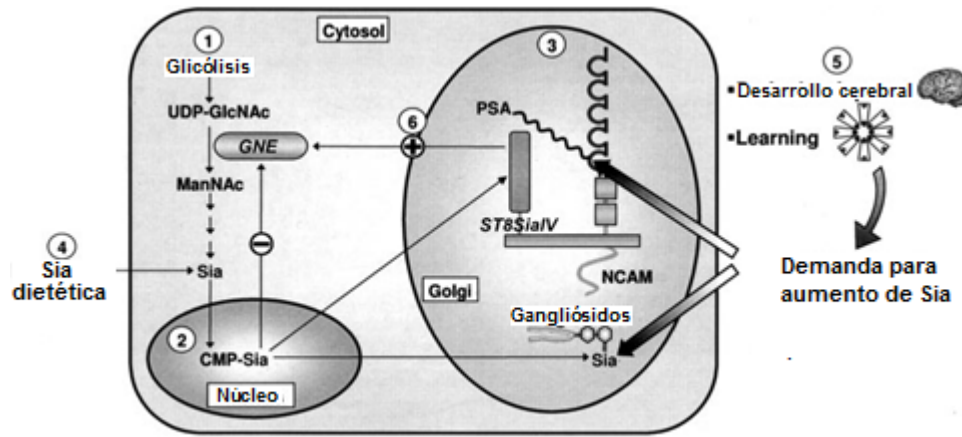
patrón de los aminoácidos varió ligeramente (Tabla 1). Aunque es poco probable, no podemos descartar la posibilidad de que las pequeñas diferencias en la ingesta de aminoácidos específicos causaron cambios en los resultados del aprendizaje.

Examinamos la posibilidad de que las diferencias en las respuestas del estrés pueden influir en el rendimiento del aprendizaje y la memoria. Las concentraciones plasmáticas de cortisol (una medida rudimentaria del nivel de estrés) no variaron de los grupos (Figura 8) y no se correlacionó con el rendimiento del aprendizaje o la memoria. Las concentraciones de cortisol disminuyeron significativamente después de la primera semana y se mantuvieron constantes después de eso, lo que sugiere que los lechones se habían habituado a su entorno a principios de la semana 2. De hecho, los lechones parecieron disfrutar de los ensayos de aprendizaje y fueron "orgullosos" de sus éxitos.

También exploramos la relación entre el rendimiento del aprendizaje y las diferencias en la concentración del ácido siálico del cerebro. En la corteza frontal, las moléculas de ácido siálico pueden estar ligadas a lípidos o ligadas a proteínas, formando los grupos terminales funcionales de gangliósidos y glicoproteínas, respectivamente. En lechones, las concentraciones de ambas formas fueron más bajas que las encontradas en los infantes (10, 26) y el cerdo adulto (21). La suplementación de CGMP se asoció con una mayor concentración del 10% de ambas formas de ácido siálico del cerebro, pero solamente la fracción unida a las proteínas mostró una relación dosis-respuesta significativa (*P* = 0.001). Debido a la forma ligada del gangliósido mostró mayor variación interindividual, un mayor tamaño de la muestra es necesario para lograr la potencia adecuada en futuros estudios. Además, debe determinarse la distribución de los diferentes tipos de gangliósidos porque algunos tipos pueden ser más importantes para el aprendizaje y la memoria que otros.

Muchos estudios han demostrado que el comportamiento del aprendizaje aumenta la incorporación del ácido siálico del cerebro. En particular, la síntesis del gangliósido aumenta después del acondicionamiento activo de la anulación a largo plazo en ratas





**FIGURA 10.** Mecanismo propuesto como ácido siálico dietético y la función celular de la influencia del aprendizaje durante el desarrollo del cerebro. 1) Ácido siálico endógeno (Sia) se produce en el citosol a partir de glucosa o de los productos de la glucólisis. La enzima epimerasa de UDP-*N*-acetilglucosamina-2-epimerasa /*N*-acetilmanosamina quinasa (*GNE*) es responsable por el paso de limitación de velocidad, convirtiendo UDP-GlcNAc al precursor del ácido siálico, *N*- acetil -D- manosamina (ManNAc). La actividad de *GNE* es baja en recién nacidos (18). 2) en el núcleo, se activa el ácido siálico a citidina 5'- monofosfato (CMP-Sia), el sustrato para la sialiltransferasas como polisialiltransferasa  $\alpha$ -2,8-sialiltransferasa IV (*ST8SiaIV*). 3) Dentro del aparato de Golgi, los residuos del ácido siálico son transferidos a aceptores, incluyendo los gangliosidos y la molécula de adhesión celular neural (NCAM). La concentración intracelular del ácido siálico conduce la síntesis del ácido polisialílico (PSA) en NCAM (30). CMP-Sia ejerce inhibición de retroalimentación negativa sobre *GNE*, limitando la producción excesiva de ácido siálico libre (30). 4) La suplementación de la dieta con ácido siálico evita *GNE*, aumentando la cantidad de ácido siálico disponible para el metabolismo y por lo tanto CMP-Sia para la síntesis de ácido polisialílico. 5) El desarrollo normal del cerebro y el aprendizaje activo aumentan el requisito de las estructuras sialiladas, incluidos los gangliosidos cerebrales y NCAM (26, 27). 6) Proponemos que el aprendizaje aumentado o la actividad de *ST8SiaIV* más alta automáticamente aumenta la expresión del *GNE*, acoplado así la síntesis de ácido siálico endógeno a la síntesis de ácido polisialílico. Así pues, durante épocas de demanda alta de ácido siálico (aprendizaje y crecimiento del cerebro), la retroalimentación inhibitoria de CMP-Sia en *GNE* se reduce al mínimo.

(27) y aumentos dependientes del tiempo en la polisialilación de NCAM ocurren dentro de 12 – 24 h de entrenamiento de escape pasivo (16). NCAM es el principal portador de ácido polisialílico en el sistema nervioso central, y cambios en el estado de polisialilación facilitan la formación de la memoria (28, 29). La evidencia es fuerte que la concentración de ácido siálico en las células regula el contenido de ácido polisialílico en NCAM (30). El aumento de la disponibilidad de ácido siálico por sobreexpresión de *GNE* con el uso de las células transfectadas de *GNE*-sialuria o por la adición de *N*-acetil -D- manosamina (el producto de la reacción de *GNE* y el precursor fisiológico del ácido siálico) aumenta dramáticamente la cantidad de ácido polisialílico de NCAM (30). Los resultados del presente estudio sugieren que lo contrario también es cierto; es decir, que aumenta en ácido polisialílico en NCAM hasta regular la síntesis de ácido siálico. Esto explicaría por qué la cantidad de suplemento de ácido siálico correlacionado no sólo con mayor rendimiento del aprendizaje sino también con un inesperado aumento en la expresión de *GNE* ( $P = 0.009$  y  $0.004$  en el hipocampo y el hígado, respectivamente). Además, en cada lugar (hígado, hipocampo, corteza frontal), el nivel de mRNA de *ST8SIA4* correlacionado con el nivel de mRNA de *GNE* ( $n=53$ ,  $P=0.0001$ ,  $0.038$  y  $0.016$ , respectivamente). Esto implica que ambas enzimas trabajan en conjunto para aumentar la síntesis de ácido polisialílico de NCAM durante el aprendizaje activo. Porque los recién nacidos tienen una limitada capacidad de síntesis de novo de ácido siálico (18), es concebible que una dieta deficiente en la sustancia preformada reduce la capacidad de aprendizaje temprano, a su vez reducir la demanda para la síntesis endógena de ácido polisialílico NCAM y por lo tanto la necesidad de ácido siálico por sí mismo. Los mecanismos propuestos por el cual las fuentes exógenas y endógenas de ácido siálico podrían influir en bioquímica del cerebro se muestran en **Figura 10**. Nuestro estudio no puede contestar la pregunta si los suplementos dietéticos de ácido siálico aumentan la síntesis del tejido neural en la ausencia de actividad del aprendizaje. Por lo tanto, se necesitan estudios adicionales que incorporen simulado y diferidos tratamientos de aprendizaje.

Porque la regulación postranscripcional del gen podría ser importante, nos esforzamos para medir la actividad enzimática real en la corteza frontal. Por desgracia, la actividad específica de *ST8SiaIV* sola no podría ser determinada porque no se había establecido la separación de las isoformas de polisialiltransferasa en el momento del estudio. Aunque la actividad total de la sialiltransferasa no difirió entre el control y los grupos suplementados, una medida del rendimiento del aprendizaje (el número de errores en la tarea fácil) estuvo libremente relacionada con la actividad enzimática total ( $r = -0.336$ ,  $P = 0.017$ ; Figura 7B) y fue significativo cuando se consideran sólo los últimos 20 ensayos ( $r = -0.282$ ,  $P = 0.047$ ). Tomados en conjunto, nuestros resultados proporcionan evidencia que el ácido siálico desde una glicoproteína fuente (CGMP) puede facilitar el desarrollo temprano del cerebro en lechones jóvenes cuando alimentados en cantidades hasta e incluyendo la cantidad presente en leche de cerda madura. Especulamos que las grandes cantidades de oligosacáridos sialilados en la leche humana madura (700 mg/L) pueden ser un mecanismo al cual la lactancia materna promueve mayor rendimiento cognitivo en los niños. Es motivo de preocupación la relativamente pequeña cantidad de ácido siálico en fórmulas para lactantes (0 –200 mg/L) (9). Los estudios futuros deben examinar la seguridad y la efectividad de las fórmulas de suplementos de ácido siálico para promover el desarrollo del cerebro en los bebés prematuros y de bajo peso al nacer.

Agradecemos a Alison Staples, Paul Quaggiotto, y Zia Ahmad por su participación en varias partes del estudio. Agradecemos a Maria Makrides, Stewart Truswell, Louise Baur, Emma Whitelaw, Patricia McVeagh, y Justin Harris por los comentarios sobre el manuscrito.

BW participó en el estudio de diseño del proyecto, todas las recopilaciones de los datos, la interpretación de los datos y la preparación del manuscrito; BY participó en el diseño del estudio del trabajo molecular; MK participó en la recolección de los datos de la actividad de la sialiltransferasa y la prueba del comportamiento del aprendizaje; HH participó en la recolección de los datos del trabajo molecular; YS participó en la recolección de datos del aprendizaje y prueba de comportamiento; PM y SH participaron en el diseño del estudio de la prueba de comportamiento del aprendizaje del lechón; PP participó en el análisis





estadístico; JB-M participó en el diseño del estudio del proyecto, datos interpretación y la preparación del manuscrito. Ninguno de los autores tenían un conflicto financiero de intereses.

REFERENCIAS

1. Anderson JW, Johnstone BM, Remley DT. Breast-feeding and cognitive development: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 1999;70:525-35.
2. Lucas A, Morley R, Cole TJ, Lister G, Leeson-Payne C. Breast milk and subsequent intelligence quotient in children born preterm. *Lancet* 1992; 339:261-4.
3. Brumberg H, La Gamma EF. New perspectives on nutrition enhance outcomes for premature infants. *Pediatr Ann* 2003;32:617-25.
4. Botting N, Powls A, Cooke RW, Marlow N. Cognitive and educational outcome of very-low-birthweight children in early adolescence. *Dev Med Child Neurol* 1998;40:652-60.
5. Powls A, Botting N, Cooke RW, Marlow N. Motor impairment in children 12 to 13 years old with a birthweight of less than 1250 g. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1995;73:F62-6.
6. Botting N, Powls A, Cooke RW, Marlow N. Attention deficit hyperactivity disorders and other psychiatric outcomes in very low birthweight children at 12 years. *J Child Psychol Psychiatry* 1997;38:931-41.
7. Lucas A, Morley R, Cole TJ. Randomised trial of early diet in preterm babies and later intelligence quotient. *BMJ* 1998;317:1481-7.
8. Wang B, Brand-Miller J, McVeagh P, Petocz P. Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas. *Am J Clin Nutr* 2001;74:510-5.
9. Carlson SE. N-acetylneuraminic acid concentrations in human milk oligosaccharides and glycoproteins during lactation. *Am J Clin Nutr* 1985; 41:720-6.
10. Wang B, McVeagh P, Petocz P, Brand-Miller J. Brain ganglioside and glycoprotein sialic acid in breastfed compared with formula-fed infants. *Am J Clin Nutr* 2003;78:1024-9.
11. Carlson SE, House SG. Oral and intraperitoneal administration of N-acetylneuraminic acid: effect on rat cerebral and cerebellar N-acetylneuraminic acid. *J Nutr* 1986;116:881-6.
12. Morgan BL, Winick M. Effects of administration of N-acetylneuraminic acid (NANA) on brain NANA content and behavior. *J Nutr* 1980;110: 416-24.
13. Tang J, Rutishauser U, Landmesser L. Polysialic acid regulates growth cone behavior during sorting of motor axons in the plexus region. *Neuron* 1994;13:405-14.
14. Nakayama J, Angata K, Ong E, Katsuyama T, Fukuda M. Polysialic acid, a unique glycan that is developmentally regulated by two polysialyltransferases, PST and STX, in the central nervous system: from biosynthesis to function. *Pathol Int* 1998;48:665-77.
15. Cremer H, Lange R, Christoph A, et al. Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* 1994;367:455-9.
16. Regan CM, Fox GB. Polysialylation as a regulator of neural plasticity in rodent learning and aging. *Neurochem Res* 1995;20:593-8.
17. Muhlenhoff M, Manegold A, Windfuhr M, Gotz B, Gerardy-Schahn R. The impact of N-glycosylation on the functions of polysialyltransferases. *J Biol Chem* 2001;276:34066-73.
18. Gal B, Ruano MJ, Puente R, et al. Developmental changes in UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase activity of rat and guinea-pig liver. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1997;118:13-5.
19. Pond WG, Boleman SL, Fiorotto ML, et al. Perinatal ontogeny of brain growth in the domestic pig. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000;223:102-8.
20. Moughan PJ, Birtles MJ, Cranwell PD, Smith WC, Pedraza M. The piglet as a model animal for studying aspects of digestion and absorption in milk-fed human infants. *World Rev Nutr Diet* 1992;67:40-113.
21. Wang B, Miller JB, McNeil Y, McVeagh P. Sialic acid concentration of brain gangliosides: variation among eight mammalian species. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 1998;119:435-9.
22. Laroy W, Maras M, Fiers W, Contreras R. A radioactive assay for sialyltransferase activity using 96-well multiscreen filtration plates. *Anal Biochem* 1997;249:108-11.
23. Ramakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* 2003;339:62-6.
24. Ahissar M, Hochstein S. Task difficulty and the specificity of perceptual learning. *Nature* 1997;387:401-6.
25. Harduin-Lepers A, Mollicone R, Delannoy P, Oriol R. The animal sialyltransferases and sialyltransferase-related genes: a phylogenetic approach. *Glycobiology* 2005;15:805-17.
26. Svennerholm L, Bostrom K, Fredman P, Mansson JE, Rosengren B, Rynmark BM. Human brain gangliosides: developmental changes from early fetal stage to advanced age. *Biochim Biophys Acta* 1989;1005: 109-17.
27. Savaki HE, Levis GM. Changes in rat brain gangliosides following active avoidance conditioning. *Pharmacol Biochem Behav* 1977;7:7-12.
28. Foley AG, Hedigan K, Roullet P, et al. Consolidation of memory for odour-reward association requires transient polysialylation of the neural cell adhesion molecule in the rat hippocampal dentate gyrus. *J Neurosci Res* 2003;74:570-6.
29. Fox GB, O'Connell AW, Murphy KJ, Regan CM. Memory consolidation induces a transient and time-dependent increase in the frequency of neural cell adhesion molecule polysialylated cells in the adult rat hippocampus. *J Neurochem* 1995;65:2796-9.
30. Bork K, Reutter W, Gerardy-Schahn R, Horstkorte R. The intracellular concentration of sialic acid regulates the polysialylation of the neural cell adhesion molecule. *FEBS Lett* 2005;579:5079-83.

